

**Univerzita Karlova v Praze**

**2. lékařská fakulta**

Autoreferát dizertační práce



**VÝZNAM PRODUKCE OXIDU DUSNATÉHO A  
REAKTIVNÍCH FOREM KYSLÍKU PŘI AKUTNÍM  
KORONÁRNÍM SYNDROMU**

**NITRIC OXIDE AND REACTIVE OXYGEN SPECIES  
IN ACUTE CORONARY SYNDROME**

**MUDr. Michal Šnorek**

Praha 2013

## **Doktorské studijní programy v biomedicině**

*Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky*

Obor: Fyziologie a patofyziologie člověka

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Jaroslav Pokorný, DrSc.

Školící pracoviště: Ústav fyziologie, Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta

Autor: MUDr. Michal Šnorek

Školitel: prof. MUDr. Jan HERGET, DrSc.

Konzultant (byl-li):

Oponenti:

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba se koná dne: .....v .....hod.  
kde: .....

S disertační prací je možno se seznámit na děkanátu  
2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

# OBSAH

<b>1 ÚVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Plicní cirkulace a hypoxická plicní vazokonstrikce .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Reaktivní formy kyslíku a redoxní potenciál při HPV .....	1
<b>1.2 Akutní koronární syndrom .....</b>	<b>2</b>
1.2.1 Reperfúzní poškození myokardu .....	2
<b>2 HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE.....</b>	<b>4</b>
<b>3 REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU A DUSÍKU PŘI HPV .....</b>	<b>4</b>
<b>3.1 Metody.....</b>	<b>4</b>
3.1.1 Model izolovaných plic .....	4
3.1.2 Experimentální protokol .....	5
3.1.2.1 Experiment A – Efekt reaktivních forem kyslíku a oxidu dusnatého na inhibici hypoxické plicní vazokonstrikce .....	5
3.1.2.2 Experiment B – Efekt zvýšení bazálního cévního tonu na inhibici HPV navozenou tempolem.....	6
3.1.3 Statistická analýza.....	7
<b>3.2 Výsledky .....</b>	<b>7</b>
3.2.1 Experiment A.....	7
3.2.2 Experiment B .....	8
<b>3.3 Diskuze .....</b>	<b>10</b>
<b>4 VLIV REDOXNÍHO STAVU NA ISCHEMICKOU ODOLNOST MYOKARDU .....</b>	<b>13</b>
<b>4.1 Metody.....</b>	<b>13</b>
4.1.1 Stanovení produktů peroxidace lipidů .....	13
4.1.2 Vyvolání infarktu u pokusných zvířat .....	13
4.1.3 Analýza arytmií.....	13
4.1.4 Stanovení velikosti infarktu .....	14
4.1.5 Stanovení redoxního stavu.....	14
4.1.6 Statistická analýza.....	14
<b>4.2 Výsledky .....</b>	<b>15</b>
4.2.1 Lipofilní fluorescenční pigmenty.....	15
4.2.2 Arytmie v ischémii a reperfúzi, velikost infarktu .....	15
4.2.3 Koncentrace ketolátek.....	17

<b>4.3</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>18</b>
<b>5</b>	<b>ZÁVĚRY .....</b>	<b>21</b>
<b>6</b>	<b>POUŽITÁ LITERATURA.....</b>	<b>22</b>
<b>7</b>	<b>PUBLIKACE AUTORA.....</b>	<b>26</b>
<b>7.1</b>	<b>Publikace in extenso, které jsou podkladem dizertace .....</b>	<b>26</b>
7.1.1	S impakt faktorem.....	26
<b>7.2</b>	<b>Publikace in extenso, bez vztahu k tématu dizertace.....</b>	<b>26</b>
7.2.1	S impakt faktorem.....	26
7.2.2	Bez impakt faktoru.....	26

## Abstrakt

V kardiologii existují různé stavy spojené s uvolněním volných radikálů při některé z forem hypoxie, jako je například ventilační hypoxie nebo porucha perfúze. Úloha volných radikálů při hypoxii v kardiologii je klíčovým bodem našeho zájmu. V prezentované práci jsme se zaměřili na hypoxií indukovanou plicní vazokonstrikci a akutní ischemii myokardu.

Hypoxická plicní vazokonstrikce (HPV), jako důležitý fyziologický mechanismus, je regulována změnami produkce a interakcí reaktivních forem kyslíku (ROS). Přetrvává nicméně kontroverze, je-li HPV regulována vzestupem nebo poklesem v produkci ROS. Rovněž role oxidu dusnatého (NO) zůstává nejasná. Prezentované výsledky ukazují, že snížení koncentrace superoxidu pomocí mimetika superoxid dismutázy tempolu vede k omezení HPV nezávisle na produkci NO i bazálním tonu plicních cév.

V experimentálním modelu jsme dále studovali efekt třídenního hladovění na ischemickou odolnost myokardu. Akutní kalorická restrikce je prokazatelně spojena s omezením produkce ROS. Naše výsledky ukazují, že třídenní hladovění efektivně chrání myokard vůči dvěma hlavním následkům akutního ischemicko-reperfúzního poškození: brání vzniku závažných reperfúzních komorových arytmií a omezuje rozsah infarktu myokardu. Tyto příznivé účinky mohou být spojeny se změněným redoxním stavem mitochondrií, způsobeným zvýšenou tvorbou ketolátek a následným snížením produkce ROS.

**Klíčová slova:** Hypoxická plicní vazokonstrikce, reaktivní formy kyslíku, oxid dusnatý, reperfúzní poškození myokardu, kalorická restrikce, ketolátky

## **Abstract**

In cardiology, there are different conditions associated with the release of free radicals in some forms of hypoxia, such as ventilatory hypoxia or reduced perfusion. The role of free radicals during hypoxia in cardiology is the key point of our interest. In presented thesis, we have focused on hypoxia-induced pulmonary vasoconstriction and acute myocardial ischemia.

Hypoxic pulmonary vasoconstriction (HPV), an important physiological mechanism, is regulated by changes in the production of and interactions among reactive oxygen species (ROS). There is controversy, however, over whether HPV is mediated by an increase or a decrease in ROS production. Also, the role of nitric oxide (NO) in HPV remains unclear. Our results indicate that inhibition of HPV by the superoxide dismutase mimetic tempol does not depend on either NO production or a decrease in basal vascular tone.

The effect of three-day fasting on cardiac ischemic tolerance was investigated in another experimental model. Short-term fasting conclusively decreases ROS production. Three-day fasting effectively protected rat hearts against major endpoints of acute ischemia-reperfusion injury. It prevented severe ventricular arrhythmias and reduced the extent of myocardial infarction. These beneficial effects can be linked to altered mitochondrial redox state resulting from increased ketogenesis and subsequent reduction of ROS production.

**Key words:** Hypoxic pulmonary vasoconstriction, Reactive oxygen species, Nitric oxide, Myocardial reperfusion injury, Caloric restriction, Ketone bodies

# 1 Úvod

V kardiologii existují různé stavy spojené s uvolněním volných radikálů při některé z forem hypoxie, jako je například ventilační hypoxie nebo porucha perfúze. V prezentované práci jsme se zaměřili na hypoxií indukovanou plicní vazokonstrikci a především na reperfúzní poškození myokardu s ohledem na změny redoxního stavu.

## 1.1 Plicní cirkulace a hypoxická plicní vazokonstrikce

Zatímco každý ze systémových orgánů přijímá větší nebo menší část srdečního výdeje, plicemi protéká srdeční výdej celý. Jedním z nejvýznamnějších rozdílů mezi malým a velkým oběhem je výrazně nižší krevní tlak a hemodynamický odpor v malém oběhu. Tato skutečnost souvisí s minimálním bazálním tonem hladkého svalstva plicních cév. Hlavním způsobem regulace plicního oběhu je vazokonstrikce, která není vyvolaná nervovým systémem, nýbrž lokálním působením hypoxie. Tato hypoxická plicní vazokonstrikce (HPV), jejíž velikost závisí na stupni hypoxie, která nastupuje velmi rychle a je snadno reverzibilní po reoxygenaci, je jednou z hlavních vlastností odlišujících plicní cévy od cév systémových (Hampl V., 1997).

### 1.1.1 Reaktivní formy kyslíku a redoxní potenciál při HPV

V buňkách existuje celá řada biomolekul současně v oxidované a redukované formě (např. NADP/NADPH nebo glutathion). Archer a Weir navrhli hypotézu, podle níž je HPV důsledkem toho, že hypoxie posune poměr oxidovaných forem ku redukovaným ve prospěch forem redukovaných. Tato změna tzv. redoxního potenciálu má schopnost regulovat řadu buněčných dějů, které mohou vyústit ve vazokonstrikci (Archer S.L. *et al.*, 1986). Změna redoxního stavu může být zprostředkována změnou množství kyslíkových radikálů. Je dokonce možné, že za nízký tonus plicních cév v normoxii je zodpovědné dilatační působení trvale produkovaných reaktivních forem kyslíku (ROS). Při nedostatku kyslíku pak nemohou být tyto radikály v dostatečném množství tvořeny, což způsobí vazokonstrikci. Tuto hypotézu podporuje reverzibilní pokles produkce superoxidového radikálu v plicích při akutní hypoxii, útlum plicní cévní reaktivity působením exogenních radikálů a naopak zvýšení plicního cévního tonu a reaktivity po odstranění superoxidového radikálu dismutázou superoxidu či odstranění peroxidu vodíku katalázou. Proti hypotéze o kyslíkových radikálech a změněném

oxidoredukčním stavu buňky stojí nálezy oslabení HPV některými antioxidanty a kontrakce myocytů plicních cév vyššími dávkami ROS. Přesto je tato představa přijímanou pracovní hypotézou mechanismu HPV (Weir E.K. a Archer S.L., 1995).

Akutní ventilační hypoxie může způsobovat změny v produkci superoxidu ovlivněním mitochondriálního elektronového transportního řetězce nebo ovlivněním aktivity NADPH oxidázy (Liu J.Q. *et al.*, 2006, Marshall C. *et al.*, 1996). Podání superoxid dismutázy (SOD) nebo vysoce nespecifického blokátoru NADPH oxidázy difenyleniodonia (DPI) oslabilo HPV (Liu J.Q. *et al.*, 2003, Thompson J.S. *et al.*, 1998). Ventilační hypoxie stimuluje produkci NO a inhibice syntézy NO potencuje HPV, přehledové sdělení viz. (Hampl V. a Herget J., 2000). Superoxid reakcí s NO vytváří peroxynitrit, který má také vazokonstrikční účinky na plicní tepny (Belik J. *et al.*, 2004). Tato reakce je téměř 10x rychlejší než odstranění superoxidu pomocí superoxid dismutázy. V důsledku tak má superoxid přímý efekt na koncentraci NO. Odstranění (scavenging) superoxidu brání tvorbě peroxynitritu a může vést k posílení aktivity NO s následnou inhibicí HPV. Na druhou stranu, scavenging superoxidu může působit na HPV přímo snížením koncentrace reaktivních forem kyslíku.

## ***1.2 Akutní koronární syndrom***

Mezi akutními klinické projevy ischemické choroby srdeční (ICHS) patří nestabilní angina pectoris (NAP) a akutní infarkt myokardu (IM), které souhrnně označujeme termínem akutní koronární syndrom (AKS) (Aschermann M. *et al.*, 2004).

### **1.2.1 Reperfuční poškození myokardu**

Při akutním infarktu myokardu je časná reperfuční léčba jedinou efektivní strategií vedoucí k omezení rozsahu infarktu, jež zároveň zlepšuje klinické dopady pro pacienty. Obnovení toku krve do ischemického myokardu může nicméně způsobit reperfuční poškození, které oslabuje příznivé účinky vlastní reperfuze (Yellon D.M. a Hausenloy D.J., 2007). Je zřejmé, že v patogenezi myokardiálního poškození, zejména v reperfúzi, hrají roli reaktivní formy kyslíku. Je dokumentováno, že ROS přispívají ke vzniku reperfučních arytmií a že antioxidanty významně omezují jejich výskyt a závažnost, viz. přehledové práce (Li C. a Jackson R.M., 2002, Zweier J.L. a Talukder M.A., 2006). Ačkoli četné experimentální studie demonstrovaly příznivý efekt snížené



produkce ROS na výskyt ischemických arytmií a rozsahu infarktového ložiska, jiné práce prokázaly žádný nebo malý protektivní efekt (Imani A. *et al.*, 2011, Miura T. *et al.*, 1988, Neckar J. *et al.*, 2008).

Bylo prokázáno, že redoxní stav buňky koreluje s produkcí ROS (Aon M.A. *et al.*, 2010, Stowe D.F. a Camara A.K., 2009, Wolin M.S., 2009). Tvorba ROS a následné oxidační poškození může být redukováno různými režimy dlouhodobé kalorické (dietní) restriktce se snížením příjmu energie (Bevilacqua L. *et al.*, 2004, Colom B. *et al.*, 2007, Gredilla R. *et al.*, 2001) nebo intermitentním hladověním (Johnson J.B. *et al.*, 2007, Wan R. *et al.*, 2003). Kalorická restriktce souvisí s konceptem tzv. reduktivního stresu. Za normoxických podmínek mitochondrie fungují ve fyziologickém vyrovnaném redoxním stavu (Aon M.A. *et al.*, 2010). Redoxní páry zahrnují relativně oxidovaný pár NAD<sup>+</sup>/NADH a relativně redukované páry NADP<sup>+</sup>/NADPH a GSSG/GSH. Chemické reduktivní procesy tvořící reaktivní formy kyslíku (hlavně superoxid a peroxid vodíku) jsou podporovány primárně redukovanými pyridinovými nukleotidy, jako je NADH nebo NADPH (Shen D. *et al.*, 2005). Při zvýšené koncentraci redukovaných koenzymů tedy může docházet k vyšší produkci ROS. Posun k redukovanému stavu v mitochondriálním kompartmentu se projeví změnou poměru betahydroxybutyrát / acetoacetát (Williamson D.H. *et al.*, 1967). Betahydroxybutyrát (3-hydroxybutyrát, BHB) a acetoacetát (AcAc) představují dvě hlavní ketolátky (Mitchell G.A. *et al.*, 1995). Hladovění laboratorních zvířat zvyšuje ketogenezu (Mitchell G.A. *et al.*, 1995), která může změnit redoxní stav buňky a produkci ROS spotřebováním redukovaných nukleotidů. Zatímco kardioprotektivní efekt různých režimů dlouhodobé kalorické restriktce byl dobře zdokumentován (Ahmet I. *et al.*, 2005, Chandrasekar B. *et al.*, 2001, Varady K.A. *et al.*, 2009), dopad krátkodobého hladovění (dny před ischemickým inzultem) na odolnost myokardu vůči akutnímu ischemicko-reperfučnímu poškození nebyl předmětem většího výzkumného zájmu.

Rozhodujícím činitelem reperfučního poškození a důležitým cílem pro možnou kardioprotekci je mitochondriální PTP (mitochondrial permeability transition pore, MPTP), neselektivní kanál na vnitřní mitochondriální membráně. Při ischemii myokardu zůstává mitochondriální PTP uzavřený a otevírá se v prvních minutách reperfuze myokardu v důsledku nadbytku mitochondriální koncentrace Ca<sup>2+</sup>, oxidativního stresu, obnovení fyziologického pH a poklesem ATP. (Hausenloy D.J. a Yellon D.M., 2003).

## 2 Hypotézy a cíle práce

Cílem experimentů bylo prozkoumat na modelu izolovaných perfundovaných plic potkana, zda-li je hypoxická plicní vazokonstrikce modulována především produkcí superoxidu, nezávisle na produkci oxidu dusnatého, nebo interakcí superoxidu a NO. Zaměřili jsme se také na vliv bazálního tonu plicních cév na HPV.

V druhé studii jsme na modelu infarktu myokardu *in vivo* u potkana testovali hypotézu, že krátkodobé hladovění má kardioprotektivní efekt. Zkoumali jsme jeho vliv na rozsah infarktového ložiska a výskyt komorových arytmií navozených epizodou regionální ischemie myokardu s následnou reperfúzí. Cílem bylo také stanovit případné změny redoxního stavu v srdeční tkáni pomocí poměru betahydroxybutyrát / acetoacetát (BHB/AcAc) odrážejícího redoxní stav mitochondrií.

## 3 Reaktivní formy kyslíku a dusíku při HPV

### 3.1 Metody

Experimenty byly provedeny na dospělých samcích potkana kmene Wistar. Pro studium hypoxické plicní hypertenze jsme použili model izolovaných plic.

#### 3.1.1 Model izolovaných plic

Preparát izolovaných plic, perfundovaných fyziologickým roztokem, byl připraven podle dříve publikované metodiky (Hampl V. *et al.*, 1993, Hampl V. a Herget J., 1990, Herget J. *et al.*, 1987). Potkani byli anestetizováni intraperitoneální injekcí thiopentalu sodného (40 mg/kg tělesné hmotnosti) a ventilováni vzduchem pomocí endotracheální kanyly (50 dechů/min; vrcholový inspirační tlak 10 cm H<sub>2</sub>O, pozitivní endexpirační tlak 2 cm H<sub>2</sub>O). Poté byl otevřen hrudník a byla provedena kanylace plicnice a levé srdeční síně. Plíce byly pomocí peristaltické pumpy perfundovány fyziologickým roztokem s albuminem (4 g/100ml) (Herget J. a McMurtry I.F., 1985) a meklofenamátem (1,7 x 10<sup>-5</sup> M) konstantním průtokem (4 ml/min/100g). Za ventilace normoxickou směsí (21% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub> + 74% N<sub>2</sub>) byl blok srdce-plíce vyjmut z hrudníku a zavěšen do vyhřívané (38 °C) a zvlhčované komůrky. Výtoková kanyla z levé srdeční síně byla do perfúzního okruhu připojena přes rezervoár perfuzátu poté,

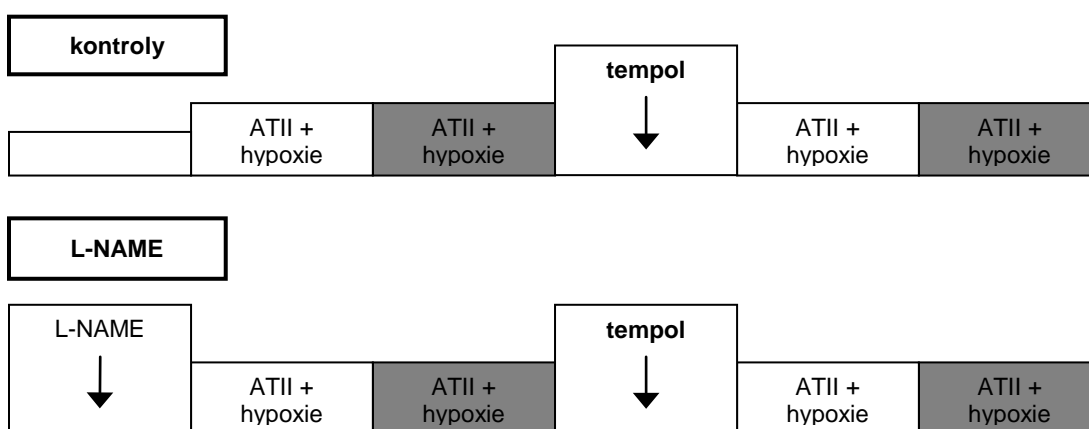
co v něm již nebyla příměs krve. Výtokový tlak byl nastaven na – 2 mm Hg. Plicní perfúzní tlak byl měřen pomocí převodníku připojeného ke vtokové kanyle (PowerLab, AD Instruments). Vzhledem k perfúznímu režimu o konstantním průtoku korespondovaly naměřené hodnoty perfúzního tlaku s plicní vaskulární rezistencí.

### 3.1.2 Experimentální protokol

#### 3.1.2.1 Experiment A – Efekt reaktivních forem kyslíku a oxidu dusnatého na inhibici hypoxické plicní vazokonstrikce

Izolované plíce byly nejprve stabilizovány po dobu 15 minut, poté byla testována cévní reaktivita na podání angiotenzinu II (ATII) (0,2 µg) a na akutní ventilační hypoxii (ventilační směs 0% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub> + 95% N<sub>2</sub>). Poté byl do perfuzátu přidán intracelulárně působící mimetikum superoxid dismutázy tempol (4-hydroxyl-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl) v dávce 0,5 mg/ml perfuzátu.. V druhé experimentální skupině (skupina L-NAME, n = 6) byla inhibována produkce NO přidáním neselektivního blokátoru všech NO syntáz (L-NAME 5x10<sup>-5</sup> M) do perfuzátu na začátku pokusu. Porovnávali jsme změny perfúzního tlaku způsobené druhým a čtvrtým cyklem ATII – hypoxie (Obr. 1).

**Obrázek 1. Protokol experimentu A - Vliv reaktivních forem kyslíku a oxidu dusnatého na hypoxickou plicní vazokonstrikci**



*Hypoxie = 6 min ventilace směsí 0% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub> + 95% N<sub>2</sub>*

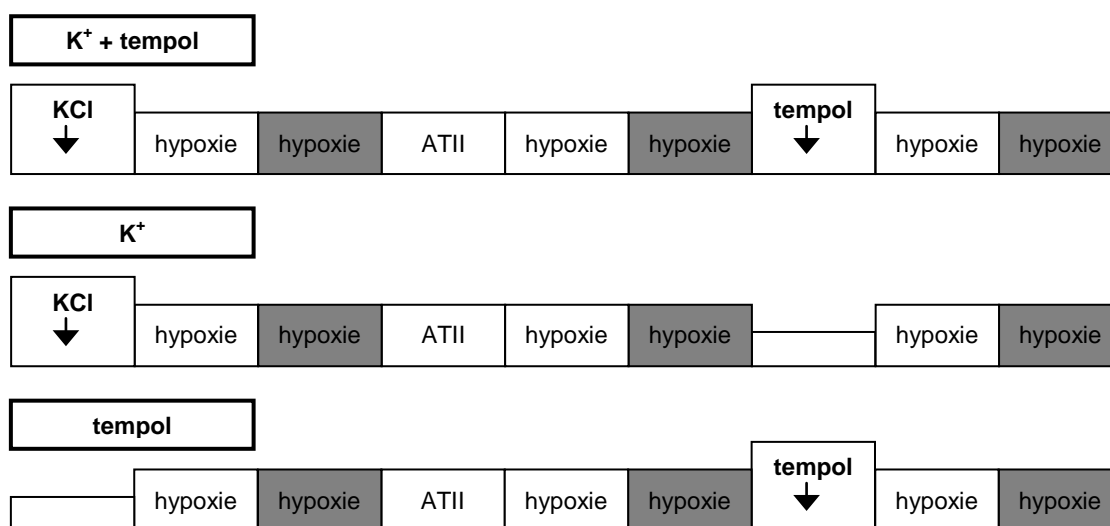
*ATII = bolusové podání angiotenzinu II (0,2 µg)*

*Porovnávali jsme 2. a 4. odpověď na podání ATII a ventilační hypoxii (šedá pole)*

### 3.1.2.2 Experiment B – Efekt zvýšení bazálního cévního tonu na inhibici HPV navozenou tempolem

Vzhledem k tomu, že vazokonstrikční odpověď plicních cév na akutní ventilační hypoxii je závislá nejen na předchozí stimulaci, ale i na jejich bazálním tonu (Fishman A.P., 1976, McMurtry I.F., 1984), rozhodli jsme se prozkoumat, zda-li je tempolem navozená inhibice HPV také závislá na bazálním tonu plicních cév. Za účelem zvýšení bazálního tonu cév v perfundovaných plicích jsme navodili depolarizaci hladkého svalu zvýšením koncentrace draslíku v perfuzátu o 15 mmol/l (výsledná koncentrace  $K^+$  byla 19,7 mmol/l). Po patnáctiminutové ekvilibraci byly izolované plíce vystaveny dvěma postupným epizodám akutní ventilační hypoxie, poté stimulovány injekcí ATII následované dvěma dalšími epizodami ventilační hypoxie. Na počátku pokusu jsme u skupin  $K^+ + \text{Tempol}$  ( $n = 5$ ) a  $K^+$  ( $n = 5$ ) přidali KCl do perfuzátu, abychom zvýšili koncentraci  $K^+$  o 15 mmol/l. Poté jsme u skupiny Tempol ( $n=5$ ) a  $K^+ + \text{Tempol}$  ( $n=5$ ) do perfuzátu přidali tempol v dávce 0,5 mg/ml perfuzátu a zopakovali jsme další dvě epizody akutní ventilační hypoxie. Mezi skupinami jsme porovnávali změny perfúzního tlaku způsobené 2., 4. a 6. epizodou akutní ventilační hypoxie (Obr. 2).

**Obrázek 2. Experimentální protokol experimentu B - Efekt zvýšení bazálního cévního tonu na inhibici HPV navozenou tempolem**



*Hypoxie = 6 min ventilace směsí 0%  $O_2$  + 5%  $CO_2$  + 95%  $N_2$*

*ATII = bolusové podání angiotenzinu II (0,2  $\mu\text{g}$ )*

*$K^+$  = zvýšení koncentrace  $K^+$  v perfuzátu o 15 mmol/l*

*Porovnávali jsme 2., 4. a 6. odpověď na ventilační hypoxii (šedá pole)*

### 3.1.3 Statistická analýza

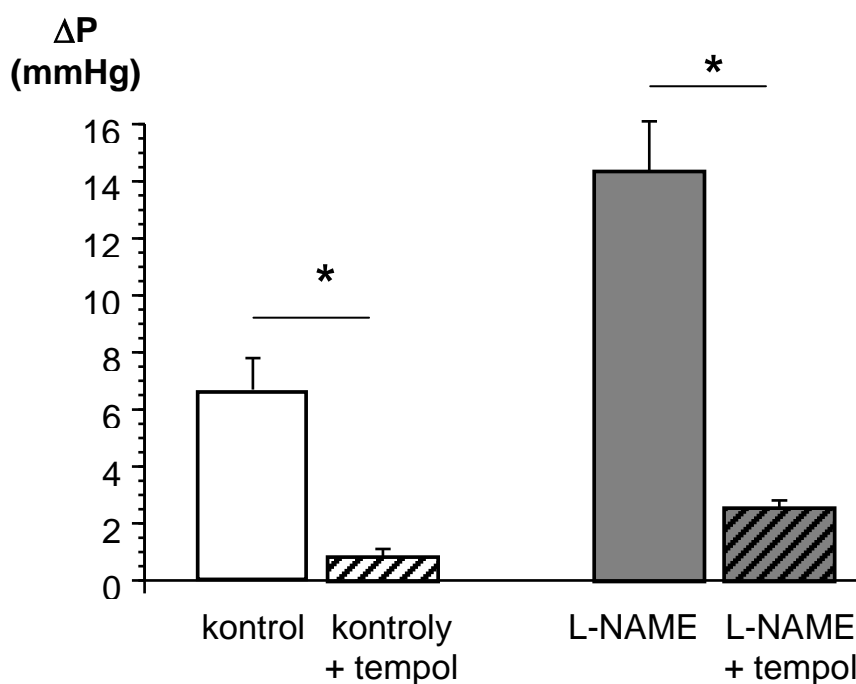
Všechny výsledky jsou vyjádřeny jako průměrné hodnoty  $\pm$  S.E.M. Statistická významnost rozdílů mezi skupinami byla určena pomocí párového testu respektive jednocestné analýzy variance (one-way ANOVA) a Fisherova PLSD post hoc testu. Rozdíly byly považovány za statisticky významné při hodnotě  $p < 0,05$ .

## 3.2 Výsledky

### 3.2.1 Experiment A

V kontrolní skupině i ve skupině L-NAME byla po podání tempolu patrná signifikantní inhibice vazokonstrikčních odpovědí jak na ATII, tak na akutní ventilační hypoxii. Ventilační hypoxií navozená vazokonstrikce byla po podání tempolu u kontrolních zvířat nižší o 89% a ve skupině L-NAME došlo k 100% potlačení vazokonstrikční reakce. Nebyl rozdíl v tempolem navozené inhibici vazokonstrikční odpovědi na akutní ventilační hypoxii mezi kontrolní skupinou a skupinou, v které byl podán L-NAME (kontroly + tempol vs. L-NAME + tempol). Podle těchto výsledků není tempolem navozená inhibice HPV závislá na produkci NO (Obr. 3, 4).

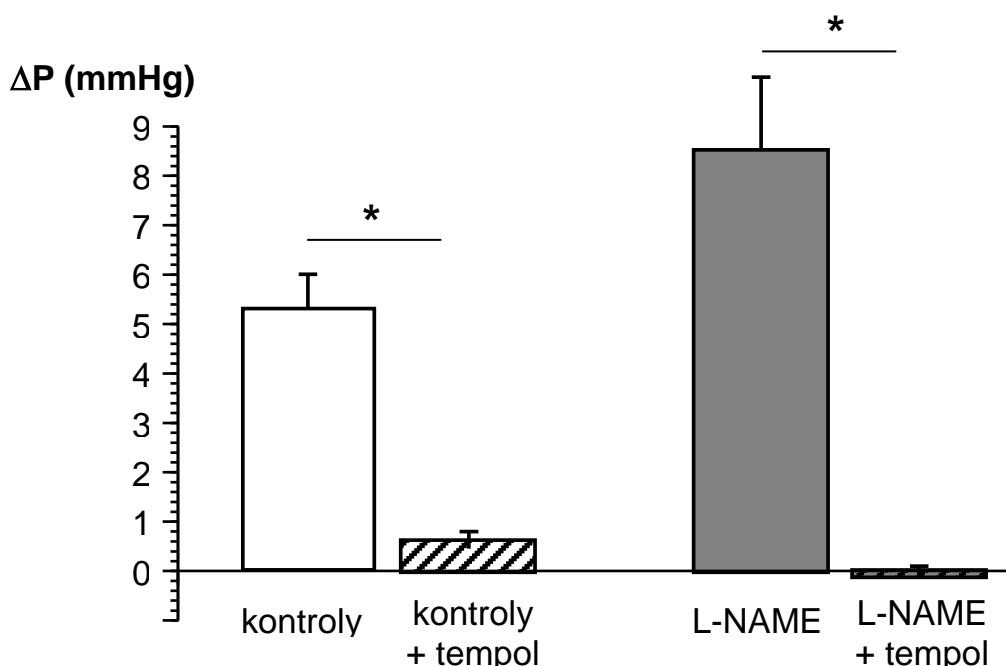
**Obrázek 3. Účinek tempolu a L-NAME na vazokonstrikci navozenou angiotenzinem II**



Graf zobrazuje rozdíly ve vazokonstrikční odpovědi na angiotenzin II před (plné sloupce) a po (šrafované sloupce) podání tempolu.

Podání tempolu významně omezilo vazokonstrikci navozenou angiotenzinem II u kontrolní skupiny i u skupiny L-NAME. Po podání tempolu nebyl mezi těmito skupinami významný rozdíl.  $\Delta P$  vyjadřuje změnu cévního tonu navozenou podáním angiotenzinu II; \*  $p < 0,005$ . Sloupce zobrazují kontrolní skupinu a skupinu L-NAME před (2. cyklus ATII – hypoxie) a po (4. cyklus ATII – hypoxie) podání tempolu.

**Obrázek 4. Účinek tempolu a L-NAME na hypoxickou plicní vazokonstrikci**



Graf zobrazuje rozdíly ve vazokonstrikční odpovědi na ventilační hypoxii před (plné sloupce) a po (šrafované sloupce) podání tempolu.

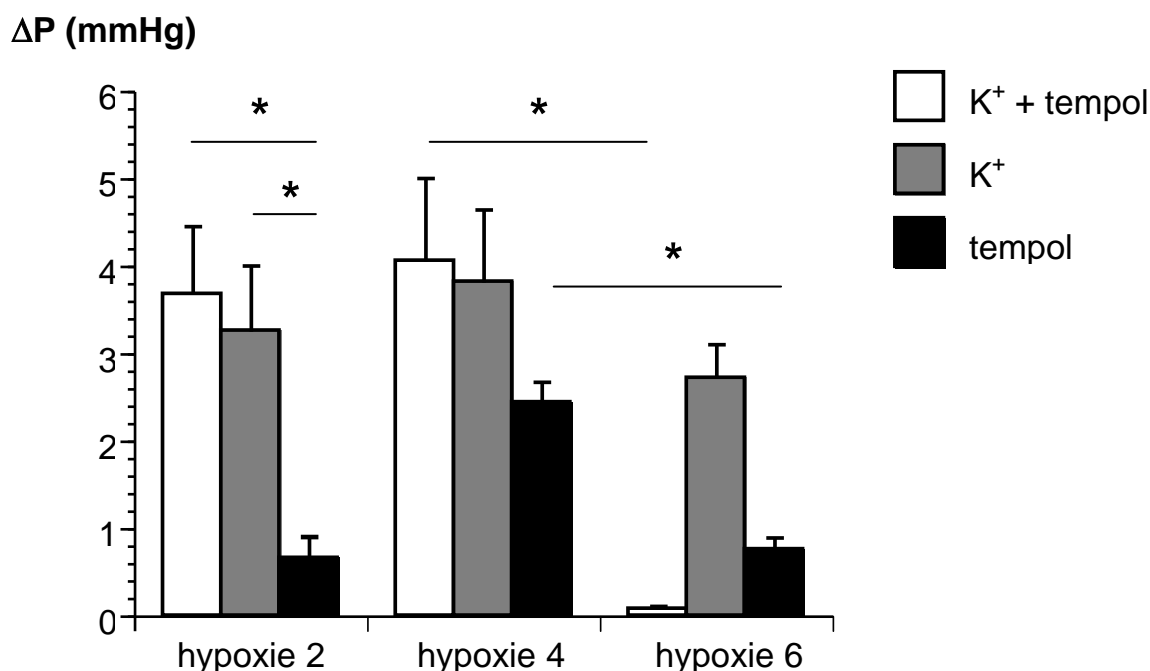
Podání tempolu významně omezilo hypoxickou plicní vazokonstrikci u kontrolní skupiny i u skupiny L-NAME. Stejně jako po podání angiotenzinu II, ani v případě HPV nebyl po podání tempolu mezi těmito skupinami významný rozdíl.  $\Delta P$  vyjadřuje změnu cévního tonu navozenou akutní ventilační hypoxií; \*  $p < 0,005$ . Sloupce zobrazují kontrolní skupinu a skupinu L-NAME před (2. cyklus ATII – hypoxie) a po (4. cyklus ATII – hypoxie) podání tempolu.

### 3.2.2 Experiment B

Přidání KCl do perfuzátu a následný vzestup koncentrace  $K^+$  ve skupině  $K^+$  + tempol a ve skupině  $K^+$  působilo zvýšení bazálního tonu plicních cév (skupina  $K^+$  + tempol: z  $9,8 \pm 0,8$  mm Hg na  $12,5 \pm 1,6$  mm Hg,  $p = 0,024$ ; skupina  $K^+$ : z  $10,5 \pm 0,6$  mm Hg na  $13,5 \pm 1,1$  mm Hg,  $p = 0,008$ ). Nebyl rozdíl v hodnotě zvýšeného perfúzního

tlaku mezi uvedenými skupinami. Vazokonstrikční odpovědi na akutní ventilační hypoxii byly vyšší, pokud byla koncentrace  $K^+$  v perfuzátu zvýšená. Pozorovali jsme signifikantně vyšší ( $p < 0,05$ ) míru HPV ve skupině  $K^+$  + tempol a skupině  $K^+$  než ve skupině tempol. Při pohledu na odpovědi na ventilační hypoxii po podání ATII jsme nepozorovali významný rozdíl mezi skupinami. Podání tempolu (skupina  $K^+$  + tempol a skupina tempol) signifikantně omezilo hypoxickou plicní vazokonstrikci jak ve skupině s vyšší koncentrací  $K^+$  (snížení HPV o 96%) tak ve skupině s normální koncentrací  $K^+$  (snížení HPV o 68%), vazokonstrikční odpovědi se mezi těmito skupinami nelišily. Na rozdíl od toho, intenzita HPV ve skupině  $K^+$  bez přidání tempolu byla konstantní, to svědčí pro viabilitu preparátu izolovaných plic v průběhu trvání experimentu (Obr. 5). Konečně, nebyl rozdíl mezi 5. a 6. epizodou ventilační hypoxie (tedy po podání tempolu) mezi skupinami (skupina  $K^+$  + tempol:  $0,2 \pm 0,0$  mm Hg vs.  $0,1 \pm 0,0$  mm Hg,  $p = 0,14$ ; skupina  $K^+$ :  $2,8 \pm 0,5$  mm Hg vs.  $2,7 \pm 0,4$  mm Hg,  $p = 0,24$ ; skupina tempol:  $0,8 \pm 0,2$  mm Hg vs.  $0,8 \pm 0,1$  mm Hg,  $p = 0,83$ ).

**Obrázek 5. Efekt koncentrace  $K^+$  na inhibici HPV navozenou tempolem**



Graf zobrazuje vzestup perfúzního tlaku navozený akutní ventilační hypoxií ( $\Delta P$ );

\*  $p < 0,05$ .

### 3.3 Diskuze

Hlavní zjištění provedené studie jsou:

1. Produkce superoxidu hraje roli v regulaci HPV. Přeměna superoxidu v peroxid vodíku způsobená podáním tempolu, mimetika superoxid dismutázy, signifikantně oslabuje vazokonstrikční odpověď plicních cév na akutní ventilační hypoxii v modelu izolovaných perfundovaných plic potkana.
2. Účinek dismutace superoxidu na HPV je spojen přímo s poklesem koncentrace superoxidu nebo se vzestupem produkce peroxidu vodíku, není způsoben relativní nadprodukcí NO.
3. Oslabení HPV po podání tempolu je nezávislé na bazálním tonu plicních cév.

Ačkoli existuje značné množství důkazů, že ROS hrají důležitou roli v regulaci tonu plicních cév během akutní a chronické ventilační hypoxie, přesný mechanismus zůstává nejasný. Kromě kontroverze, zda-li je zdrojem ROS mitochondriální elektronový transportní řetězec (Waypa G.B. *et al.*, 2001) nebo NADH oxidáza (Gupte S.A. *et al.*, 2005), přetrvávají debaty ohledně charakteru změn koncentrace ROS během hypoxie.

Jedna skupina pozorovatelů má názor, že HPV je vyvolaná náhlým poklesem produkce ROS. Redoxní teorie HPV, formulovaná Weirem a Archerem (Archer S.L. *et al.*, 1986), je založena na předpokladu kontinuální produkce ROS během normoxie. Autoři pozorovali rychlou inhibici produkce ROS jak v izolovaných perfundovaných plicích, tak i v izolované plicní tepně během akutní hypoxie. V tomto navrhovaném mechanismu je elektronový transportní řetězec ovlivněný hypoxií a produkce ROS klesá. Redukce nebo oxidace cysteinových a metioninových skupin redoxními mediátory (jako např. ROS) může vést ke konformačním změnám  $K_V$  kanálů. Tato inhibice  $K_V$  kanálů vede k depolarizaci membrány a vede k influxu  $Ca^{2+}$  cestou L-typu  $Ca^{2+}$  kanálů (Moudgil R. *et al.*, 2005). Podle této teorie existuje určitá fyziologická role kontinuální produkce ROS. Superoxid je během normoxie tvořen ve velmi malých koncentracích a antioxidantní enzymy jako superoxid dismutáza přeměňují superoxid v peroxid vodíku, který je následně katalázou transformován v  $H_2O$  a  $O_2$ . Tento mechanismus slouží jak pro buněčnou ochranu proti potenciálně škodlivým účinkům



superoxidu tak i pro kontinuální regulativní produkci  $H_2O_2$ . Pokles koncentrace  $H_2O_2$  poté vede k rozvoji HPV. Ačkoli Wolinova skupina věří, že relevantním zdrojem ROS je místo mitochondriálního elektronového transportního řetězce NADH oxidáza, i tito autoři zjistili, že pokles produkce  $H_2O_2$  vyvolá HPV (Gupte S.A. *et al.*, 2005).

Naproti tomu, Liu *et al.* měřili produkci ROS s využitím fluorescence dichlorofluoresceinu, chemiluminiscence lucigeninu (lucigenin-derived chemiluminescence, LDCL) a elektronové paramagnetické rezonance (electron paramagnetic resonance, EPR) v malých distálních prasečích plicních tepnách. Při těchto experimentech dokumentovali zvýšenou produkci ROS během hypoxie (Liu J.Q. *et al.*, 2003). Ke stejnému závěru došla Schumackerova skupina, popisující také zvýšenou produkci ROS vyvolanou akutní hypoxií (Waypa G.B. *et al.*, 2001, Waypa G.B. a Schumacker P.T., 2005).

V naší studii jsme ke snížení koncentrace superoxidu použili tempol. Tempol proniká biologickou membránou a účinkuje intracelulárně (Thiemermann C., 2003). Bylo publikováno, že protektivní efekt tempolu je dán jeho schopností odstraňovat (scavenge) superoxid a hydroxylové radikály (Sainz J. *et al.*, 2005, Thiemermann C., 2003). V aktivovaných neutrofilech tempol nesnížil produkci  $H_2O_2$ , jeho protektivní efekt nemůže být spojen s kataláze podobnou aktivitou (Hahn S.M. *et al.*, 1997). Vzhledem k našemu pozorování, že tempol inhibuje HPV, předpokládáme, že superoxid je v přítomnosti tempolu redukován na  $H_2O_2$ . V důsledku toho je při hypoxii menší pokles intracelulární koncentrace peroxidu vodíku. S ohledem na teorii, že HPV je vyvolaná náhlým poklesem v koncentraci  $H_2O_2$ , může toto být jedním z možných vysvětlení tempolem indukované inhibice HPV. Alternativní vysvětlení, vyplývající z možnosti, že intracelulární zvýšení ROS je atributem HPV, se nicméně zdá být více pravděpodobné. V případě tempolem navozené dismutace superoxidu může být nadbytek  $H_2O_2$  metabolizován katalázou a inhibice HPV pak rezultuje z nedostatečného zvýšení koncentrace ROS. Zdá být pravděpodobné, že superoxid sám je vzhledem k vysoké reaktivitě v mitochondriích rychle konvertován ve výrazně stabilnější molekulu peroxidu vodíku (Burke T.M. a Wolin M.S., 1987, Moudgil R. *et al.*, 2005). Jiným možným mediátorem HPV může být hydroxylový radikál tvořený při Fentonově reakci. Zvýšený perfúzní tlak byl pozorován v přítomnosti hydroxylového radikálu a jeho efekt byl následně inhibován dimethylthioureou (scavenger hydroxylového radikálu) (Tate R.M. *et al.*, 1982). Přesná úloha hydroxylového radikálu v regulaci HPV

Superoxid kromě přeměny na  $H_2O_2$ , způsobené superoxid dismutázou, vytváří spolu s NO rychlou reakcí peroxynitrit. Ačkoli není přesná role NO během HPV zcela jasná, mnozí autoři pozorovali, že blokátory NO syntáz jako L-NMMA nebo L-NAME signifikantně potencují vazokonstriční odpovědi na ventilační hypoxii v modelu izolovaných perfundovaných plic potkana (Archer S.L. *et al.*, 1989, Barer G. *et al.*, 1993, Hampl V. a Herget J., 2000). Odstranění superoxidu pomocí SOD nebo tempolu brání tvorbě peroxynitritu z NO, to následně přispívá k vyšší koncentraci dostupného NO. Beckman *et al.* navrhuje, že přinejmenším část protektivního efektu superoxidodismutázy může být způsobena sníženým rozkladem NO (Beckman J.S. *et al.*, 1990). Podobně Lilley *et al.* soudí, že role antioxidantů (jako je SOD, kyselina askorbová nebo redukovaný glutathion) spočívá v protekci NO vůči superoxidu (Lilley E. a Gibson A., 1996). Vzhledem k našemu zjištění, že tempol potlačil vazokonstriční reakce stejnou měrou s podáním i bez podání L-NAME, jeho inhibice HPV zřejmě nebude způsobena zvýšenou koncentrací NO.

V mechanismu HPV jsou jako možné efekторы popsány Kv kanály (Reeve H.L. *et al.*, 2001). Některé z Kv kanálů jsou senzitivní na změny oxido-redukčního potenciálu. Pokles koncentrace superoxidu nebo  $H_2O_2$  během hypoxie způsobí konformační změny těchto kanálů redukcí nebo oxidací cysteinových a methioninových skupin (Rettig J. *et al.*, 1994). Výsledné omezení toku  $K^+$  vede k depolarizaci membrány a influxu  $Ca^{2+}$  přes L-typ  $Ca^{2+}$  kanálů a následně ke kontrakci myocytů (Moudgil R. *et al.*, 2005). V izolovaných plicích potkana vede zvýšení koncentrace  $K^+$  v perfuzátu k depolarizaci hladkého svalu v cévách a následně ke zvýšení bazálního tonu plicních cév s potenciací vazokonstričních odpovědí na akutní ventilační hypoxii. Při zvyšování koncentrace  $K^+$  v perfuzátu nás zajímalo, zda-li tím lze předejít inhibici HPV způsobené tempolem. Ačkoli zvýšení koncentrace  $K^+$  signifikantně zesílilo HPV, tempol téměř kompletně vazokonstriční odpověď potlačil. Při podání tempolu nebyla odpověď na hypoxii závislá na koncentraci  $K^+$  v perfuzátu. To koresponduje s představou, že při vzniku hypoxické plicní vazokonstrikce jsou kruciólní změny v koncentraci ROS.

Prezentované výsledky demonstrují, že snížení koncentrace superoxidu pomocí tempolu vede k omezení HPV a že tento efekt není způsobený primárně oxidem dusnatým, chráněným před reakcí se superoxidem.

## **4 Vliv redoxního stavu na ischemickou odolnost myokardu**

### **4.1 Metody**

Dospělí potkani kmene Wistar byli rozděleni do dvou skupin. Zvířata v experimentální skupině neměla po dobu 3 dnů přístup k potravě, ale měla volný přístup k pitné vodě. Doba trvání hladovění byla stanovena arbitrárně. Potkani v kontrolní skupině měli volný přístup k pitné vodě i standardní laboratorní potravě.

#### **4.1.1 Stanovení produktů peroxidace lipidů**

Radikálové poškození zahrnuje peroxidaci lipidů buněčných membrán, která může být detekována stanovením jejich konečných fluorescentních produktů, tzv. lipofilních fluorescenčních pigmentů, LFP (Skoumalova A. *et al.*, 2008, Wilhelm J. a Herget J., 1999). U anestetizovaných potkanů (pentobarbital sodný, Sanofi, Francie; 60 mg/kg tělesné hmotnosti, intraperitoneálně) byl otevřen hrudník, poté jsme vyjmuli srdce, odstranili srdeční síně a volnou stěnu pravé komory srdeční. Levá komora srdeční byla zmrazena a použita pro další analýzy. Koncentrace LFP byla stanovena podle zavedené metodiky (Goldstein B.D. a McDonagh E.M., 1976). Koncentrace LFP byla vyjádřena v relativních fluorescenčních jednotkách na mg srdeční tkáně (RFU/mg).

#### **4.1.2 Vyvolání infarktu u pokusných zvířat**

Pro studium reperfučního poškození myokardu jsme použili model infarktu myokardu *in vivo*. Zvířata byla anestetizována pomocí pentobarbitalu sodného (Sanofi, Francie; 60 mg/kg tělesné hmotnosti, intraperitoneálně). Zvířata byla uměle ventilována pokojovým vzduchem o frekvenci 65-70 dechů/min (dechový objem 1,2 ml/100 g tělesné hmotnosti). Kontinuálně byl pořizován jednosvodový EKG záznam a invazivně měřen krevní tlak. Provedením levostranné torakotomie a perikardektomie jsme ozřejmili průběh přední sestupné větve levé koronární artérie (RIA, LAD). Regionální ischemie myokardu trvající 20 minut byla navozena pomocí ligatury, umístěné cca 1-2 mm distálně od odstupu RIA. Po 20 minutách trvání ischemie byla ligatura povolena a poté následovala reperfuční fáze.

#### **4.1.3 Analýza arytmií**

Výskyt a závažnost komorových arytmií v průběhu ischemie a na počátku reperfuze byly analyzovány v souladu s Lambethskou konvencí (Walker M.J. *et al.*,

1988). Pro účely této studie jsme hodnotili výskyt předčasných komorových stahů (premature ventricular complexes, PVCs) a dobu trvání komorové tachykardie (ventricular tachycardia, VT)

#### **4.1.4 Stanovení velikosti infarktu**

Po 3 hodinách reperfúze byla srdce vyjmuta z hrudníku. Stanovení ohrožené oblasti myokardu a rozsahu infarktového ložiska bylo provedeno v souladu s dříve publikovanou metodikou (Neckar J. *et al.*, 2002) barvením manganistanem draselným (Lachema, Česká republika) a 2,3,5-triphenyltetrazolium chloridem (Sigma, USA) rozpuštěným v 0,1 mol / l fosfátovém pufru (pH 7,4). Velikost infarktového ložiska (infarct size, IS), rozsah ohrožené oblasti myokardu (area at risk, AR) a velikost levé komory (left ventricle, LV) byly kvantifikovány planimetricky. Velikost infarktového ložiska byla standardně vztažena k rozsahu ohrožené oblasti myokardu (IS/AR) a ohrožená oblast myokardu byla vztažena k velikosti levé komory srdeční (AR/LV).

#### **4.1.5 Stanovení redoxního stavu**

V separátních skupinách operovaných zvířat byla vyjmuta srdce buď před a nebo po 20 minutové fázi regionální ischemie myokardu. K přibližně 1,5 g zmražené a rozdrcené srdeční tkáně byl přidán stejný objem 7% kyseliny chloristé ( $\text{HClO}_4$ ) a po homogenizaci a 10 minutách precipitace proteinů byla tato směs centrifugována (6 000 RPM, 30 min). Vzniklý supernatant byl poté odebrán a neutralizován pomocí uhličitanu draselného ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ ). Po dalších 20 minutách byl vzorek opět 15 minut centrifugován a byl odebrán homogenizovaný supernatant. Ten byl následně rozdělen na tři alikvoty, každý o hmotnosti cca 0,5 g, které byly použity pro vlastní biochemické analýzy. Stanovení koncentrace betahydroxybutyrátu (BHB) a acetoacetátu (AcAc) bylo provedeno podle dříve publikované metodiky (Mintz S. a Robin E.D., 1971).

#### **4.1.6 Statistická analýza**

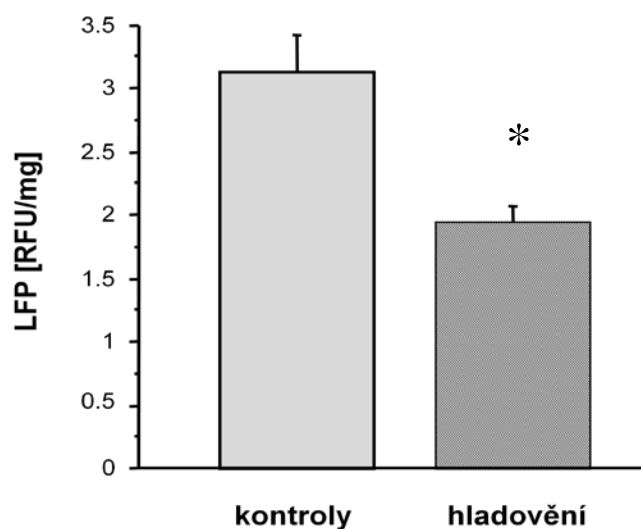
Všechny výsledky jsou vyjádřeny jako průměrné hodnoty  $\pm$  S.E.M. Statistická významnost rozdílů mezi skupinami byla určena pomocí jednocestné analýzy variance (one-way ANOVA), Fisherova PLSD post hoc testu a Games/Howellova post hoc testu. Rozdíly byly považovány za statisticky významné při hodnotě  $p < 0,05$ .

## 4.2 Výsledky

### 4.2.1 Lipofilní fluorescenční pigmenty

Koncentrace fluoroforu 350/440 (excitace / emise, nm) lipofilních fluorescenčních pigmentů (LFP) v srdeční tkáni tři dny hladovějících potkanů byla signifikantně snižena ve srovnání s kontrolní skupinou. Snižená koncentrace LFP svědčí pro menší produkci volných kyslíkových radikálů po akutním hladovění (Obr. 6).

**Obrázek 6. Koncentrace lipofilních fluorescenčních pigmentů**

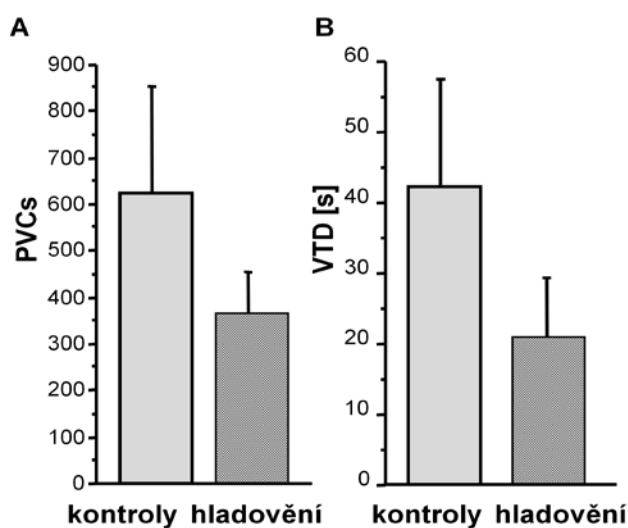


*Koncentrace LFP (vyjádřená v relativních fluorescenčních jednotkách RFU na mg srdeční tkáně) v srdcích kontrolních a hladovějících potkanů. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  S.E.M., \*  $p < 0.005$ .*

### 4.2.2 Arytmie v ischemii a reperfúzi, velikost infarktu

Po třídním hladovění byl patrný trend ke snížení výskytu ischemických komorových arytmií, jak dokumentuje celkový počet předčasných komorových stahů (Obr. 7A) a k omezení délky trvání komorových tachykardií o 40-50% (Obr. 7B), ale rozdíly mezi experimentální a kontrolní skupinou nedosáhly statistické významnosti.

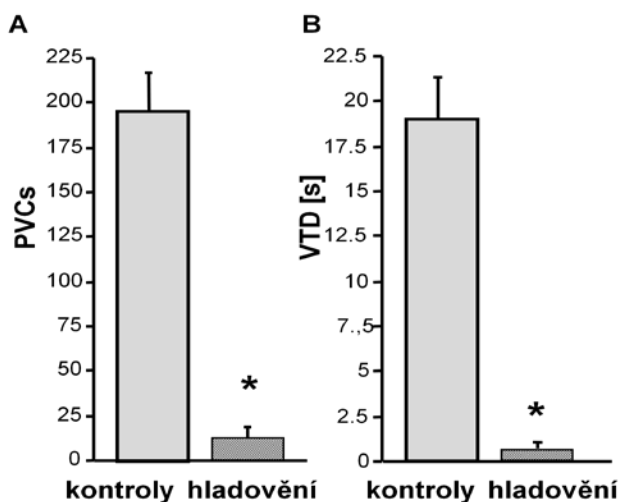
## Obrázek 7. Ischemické komorové arytmie



(A) Celkový počet předčasných komorových stahů (PVCs) a (B) celková doba trvání komorových tachykardií (VTD) během 20 minutové epizody regionální ischemie myokardu u kontrolních a hladovějících potkanů. Hodnoty vyjádřeny jako průměr  $\pm$  S.E.M. z 12 hladovějících a 11 kontrolních zvířat.

Třídenní hladovění bylo však spojeno se statisticky signifikantně nižším výskytem arytmií v časně reperfuční fázi, došlo k poklesu počtu předčasných komorových stahů i délky trvání komorových tachykardií (Obr. 8A,B).

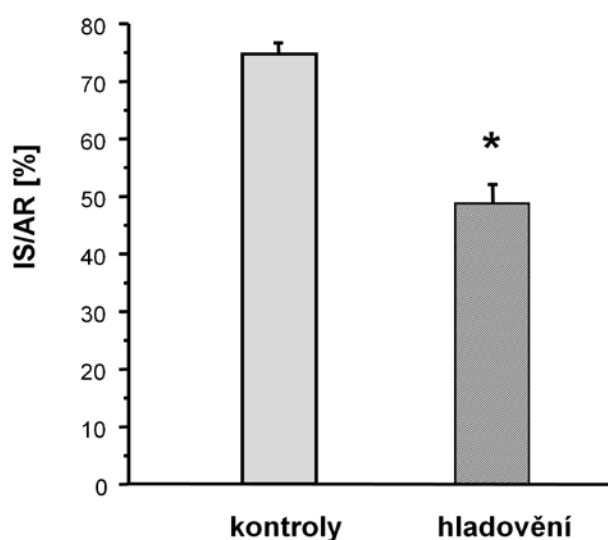
## Obrázek 8. Reperfuční komorové arytmie



(A) Celkový počet předčasných komorových stahů (PVCs) a (B) celková doba trvání komorových tachykardií (VTD) během prvních tří minut reperfuze u kontrolních a hladovějících potkanů. Hodnoty vyjádřeny jako průměr  $\pm$  S.E.M. z 12 hladovějících a 11 kontrolních zvířat. \*  $P < 0.05$ .

Oblast myokardu ohrožená vznikem infarktu myokardu (area at risk, AR) normalizovaná na velikost levé komory srdeční (left ventricle, LV) se významně nelišila mezi hladovějícími a kontrolními zvířaty (AR/LV:  $38,5 \pm 3,1\%$  a  $42,3 \pm 4,8\%$ ). Tento ukazatel svědčí pro uniformitu provádění výše popsané chirurgické procedury a je východiskem pro vzájemnou porovnatelnost experimentálních skupin. Velikost infarktového ložiska (infarct size, IS) dosáhla v kontrolní skupině  $74,3 \pm 2,2\%$  ohrožené oblasti (area at risk, AR), zatímco u hladovějících potkanů byla hodnota IS/AR statisticky signifikantně nižší, tj.  $48,5 \pm 3,3\%$  (Obr. 9).

**Obrázek 9. Rozsah infarktového ložiska**



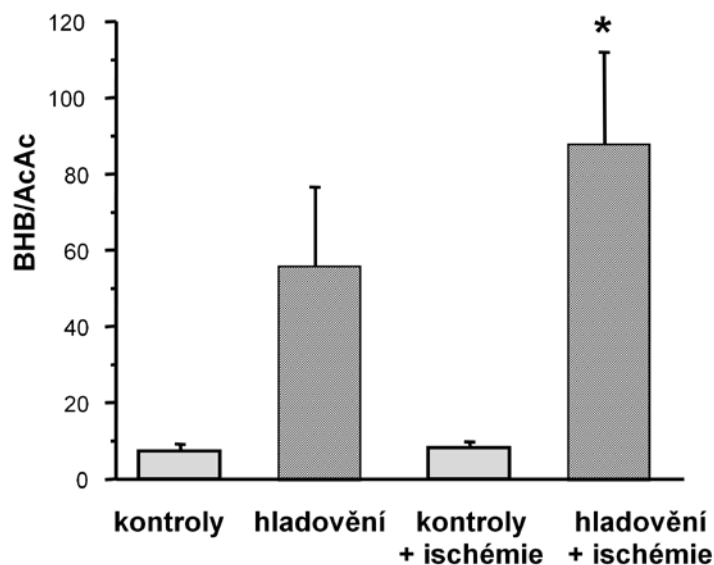
*Velikost infarktového ložiska vyjádřená jako procentuální podíl ohrožené oblasti (IS/AR) u kontrolních a hladovějících potkanů. Hodnoty vyjádřeny jako průměr  $\pm$  S.E.M. z 6 hladovějících a 5 kontrolních zvířat. \*  $P < 0.05$ .*

#### **4.2.3 Koncentrace ketolátek**

Třídenní hladovění vedlo k statisticky signifikantnímu vzestupu koncentrace BHB v myokardu na  $15,58 \pm 2,56$  mM/g ve srovnání s kontrolní skupinou ( $1,22 \pm 0,21$  mM/g), přitom koncentrace AcAc se mezi skupinami nelišila. Ačkoliv poměr BHB/AcAc se u hladovějících potkanů zvýšil přibližně šestkrát, jeho rozdíl nedosáhl statistické významnosti vzhledem k vysoké variabilitě naměřených hodnot (Obr. 10). Vystavení potkanů regionální ischemii myokardu bylo spojeno s trendem k dalšímu

vzestupu koncentrace BHB v hladovějící skupině zvířat ve srovnání s kontrolní skupinou, zatímco koncentrace AcAc zůstala neměnná u obou skupin. V důsledku byl poměr BHB/AcAc po vystavení epizodě regionální ischemie myokardu signifikantně nižší u hladovějících potkanů (Obr. 10).

**Obrázek 10. Poměr koncentrace betahydroxybutyrátu a acetoacetátu**



*Poměr beta-hydroxybutyrát / acetoacetát (BHB/AcAc) v myokardu levé komory srdeční u kontrolních a hladovějících potkanů, před a po 20 minutové epizodě regionální ischemie myokardu. Hodnoty vyjádřeny jako průměr ± S.E.M. z 9 – 11 zvířat v každé skupině. \*  $P < 0.05$  vs. kontrolny.*

### 4.3 Diskuze

Prezentovaná studie demonstruje, že krátkodobé hladovění bez omezení příjmu tekutin omezilo rozsah akutního infarktu myokardu navozeného epizodou regionální ischemie-reperfúze a významně snížilo celkový počet předčasných komorových stahů (PVCs) a celkovou délku trvání komorové tachykardie (VTD) v časně reperfúzní fázi. Kromě toho, hladovění zvýšilo poměr BHB/AcAc v myokardu reflektující změněný redoxní stav mitochondrií. Nižší koncentrace lipofilních fluorescenčních pigmentů (LFP) reflektuje sníženou produkci ROS při krátkodobém hladovění.

Konzistentně s našim pozorováním, hladovění potkanů trvajících 24 hodin zlepšilo poischemické obnovení kontraktlní funkce levé komory srdeční a snížilo tvorbu laktátdedydogenázy v modelu izolovaného srdce vystaveného globální ischemii-reperfúzi (Marina Prendes M.G. *et al.*, 2005). Srdce přes noc (16 - 20 hod)



hladovějících potkanů také vykazovala lepší obnovení kontraktilní funkce a zachování strukturální integrity mitochondrií po ischemii-reperfúzi než v případě kontrolních zvířat (Doenst T. *et al.*, 1996). Mimo to, třídní hladovění se zachováním příjmu tekutin u myši bylo spojeno s protekcí vůči ischemicko-reperfúznímu poškození ledvin, srovnatelnou rozsahem s efektem 2-4 týdenní 30% dietní restrikce. Je zajímavé, že funkční protekce ledvin způsobená tímto krátkodobým hladověním byla rychle ztracena během několika hodin po opětovném zahájení příjmu potravy (Mitchell J.R. *et al.*, 2010). To může svědčit pro jiný mechanismus této protekce než při dlouhodobé dietní restrikci.

Ačkoliv není kardioprotektivní mechanismus krátkodobého hladovění doposud zcela objasněn, zdá se pravděpodobné, že snížená produkce ROS a omezení oxidativního poškození hraje přinejmenším částečnou roli. Bylo prokázáno, že v myokardu potkanů hladovějících 24 hodin je po ischemii-reperfúzi vyšší poměr GSH/GSSG a nižší hladina markerů peroxidace lipidů než u sytých zvířat (Marina Prendes M.G. *et al.*, 2009). Je bohatá evidence, že déletrvající režimy dietní restrikce také snižují produkci ROS. Například, Bevilacqua *et al.* prokázali u potkanů vystavených 40% kalorické restrikci po dobu 2 týdnů až 6 měsíců nižší produkci peroxidu vodíku v mitochondriích kosterních svalů (Bevilacqua L. *et al.*, 2004). Podobný režim (trvající 6 týdnů) vedl ke snížení produkce peroxidu vodíku v jaterních mitochondriích u potkana (Gredilla R. *et al.*, 2001). Judge *et al.* prokázali nižší produkci peroxidu vodíku v mitochondriích myokardu u potkanů vystavených 10 – 40 % kalorické restrikci po dobu 2 měsíců v porovnání s normálně krmenými zvířaty (Judge S. *et al.*, 2004). Rovněž tříměsíční 40 % kalorická restrikce potkanů vedla k přítomnosti nižšího počtu více efektivních mitochondrií v myokardu, které produkovaly méně peroxidu vodíku a menšímu oxidativnímu poškození než u standardně krmených potkanů (Colom B. *et al.*, 2007). Klinickou relevanci výše uvedených dat z experimentů se zvířaty podporují mimo jiné i výsledky studie, ve které 8 týdenní intermitentní hladovění osob s nadváhou vedlo k významnému snížení markerů oxidativního stresu, jako je 8-isoprostan nebo nitrotyrosin (Johnson J.B. *et al.*, 2007).

Byl patrný významný efekt třídního hladovění na redoxní stav mitochondrií, posuzovaný podle poměru BHB/AcAc. Zvýšená produkce ketolátů a BHB/AcAc byla detekována také po dlouhodobém hladovění (Laffel L., 1999). Tato data jsou v souladu s konceptem reduktivního stresu, který nicméně zůstává kontroverzní (Ghyczy M. a Boros M., 2001, Lipinski B., 2002, Zhang X. *et al.*, 2010). Naše výsledky změněného

mitochondriálního redoxního stavu svědčí pro klíčovou roli mitochondrií v získání tolerance myokardu vůči ischemicko-reperfúznímu poškození.

Bylo prokázáno, že podání exogenního BHB omezilo rozsah infarktu myokardu a apoptózy navozené epizodou ischemie-reperfúze u potkanů (Zou Z. *et al.*, 2002). Vzhledem k roli ketolátek v kardioprotekci navozené hladověním může být zajímavé srovnání s časnými stádii diabetu mellitu. Chen *et al.* při studiu vlivu streptozotocinem navozeného diabetu u potkanů na metabolismus myokardu pozorovali významnou hyperketonémii již dva dny po podání streptozotocinu (Chen V. *et al.*, 1984). Jeden týden po navození diabetu byl u potkanů vystavených ischemii-reperfúzi myokardu rozsah infarkového ložiska menší než u kontrolní skupiny zvířat (Ravingerova T. *et al.*, 2003). Nelze tedy vyloučit, že krátkodobé hladovění a časná stadia experimentálně navozeného diabetu mohou působit, přinejmenším zčásti, podobným mechanismem, pravděpodobně závislým na ketolátkách, vedoucím ke zlepšení ischemické odolnosti myokardu.

Krátkodobé hladovění zvířat, přijímajících pouze tekutiny, je pravděpodobně spojeno také se stresem, který může vést k preconditioningu myokardu vůči následným stresovým situacím včetně ischemie-reperfúze. Protekce myokardu navozená hladověním může nicméně být stejně účinná jako ischemický preconditioning (Doenst T. *et al.*, 1996). Můžeme například spekulovat, že tolerance hladovějících zvířat vůči ischemii je spojena se zvýšenou sympatickou stimulací a ochrannou signalizací pomocí katecholaminů. Schopnost katecholaminů působit preconditioning vůči ischemii-reperfúzi byla v minulosti popsána (Lochner A. *et al.*, 1999, Ravingerova T. *et al.*, 1995).

Naše výsledky ukazují, že třídenní hladovění efektivně chrání myokard potkanů vůči dvěma hlavními následkům akutního ischemicko-reperfúzního poškození: infarktu myokardu a repurfúzním komorovým arytmiím. Tyto příznivé účinky mohou být spojeny se změněným redoxním stavem mitochondrií, způsobeným zvýšenou tvorbou ketolátek a následným snížením produkce reaktivních forem kyslíku.

## 5 Závěry

Hypoxická plicní vazokonstrikce, jako důležitý fyziologický mechanismus, je regulována změnami produkce a interakcí reaktivního forem kyslíku. Přetrvává nicméně kontroverze, je-li hypoxická plicní vazokonstrikce regulována vzestupem nebo poklesem v produkci reaktivních forem kyslíku. Rovněž role oxidu dusnatého zůstává nejasná. Prezentované výsledky ukazují, že snížení koncentrace superoxidu pomocí mimetika superoxidodismutázy tempolu vede k omezení hypoxické plicní vazokonstrikce nezávisle na produkci oxidu dusnatého i bazálním tonu plicních cév.

Naše výsledky dále ukazují, že třídní hladovění efektivně chrání myokard potkanů vůči dvěma hlavním následkům akutního ischemicko-reperfúzního poškození: brání vzniku závažných reperfúzních komorových arytmií a omezuje rozsah infarktu myokardu. Tyto příznivé účinky mohou být spojeny se změněným redoxním stavem mitochondrií, způsobeným zvýšenou tvorbou ketolátek a následným snížením produkce reaktivních forem kyslíku. Různé formy kalorické restrikce mají protektivní účinek na ischemický myokard, zprostředkovaný omezením produkce reaktivních forem kyslíku. Úprava diety u nemocných s ischemickou chorobou srdeční tak může mít pozitivní efekt nejen svým účinkem na proces aterosklerózy.

## 6 Použitá literatura

1. AHMET I, WAN R, MATTSON MP, *et al.* Cardioprotection by intermittent fasting in rats. *Circulation*. 2005,**112**(20),3115-3121.
2. AON MA, CORTASSA S, O'ROURKE B. Redox-optimized ROS balance: a unifying hypothesis. *Biochim Biophys Acta*. 2010,**1797**(6-7),865-877.
3. ARCHER SL, TOLINS JP, RAIJ L, WEIR EK. Hypoxic pulmonary vasoconstriction is enhanced by inhibition of the synthesis of an endothelium derived relaxing factor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989,**164**(3),1198-1205.
4. ARCHER SL, WILL JA, WEIR EK. Redox status in the control of pulmonary vascular tone. *Herz*. 1986,**11**(3),127-141.
5. ASCHERMANN M, WIDIMSKÝ P, VESELKA J, *et al.* Kardiologie. Praha: Galén, 2004:1540.
6. BARER G, EMERY C, STEWART A, *et al.* Endothelial control of the pulmonary circulation in normal and chronically hypoxic rats. *J Physiol (Lond)*. 1993,**463**(1-16).
7. BECKMAN JS, BECKMAN TW, CHEN J, *et al.* Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990,**87**(4),1620-1624.
8. BELIK J, JANKOV RP, PAN J, TANSWELL AK. Peroxynitrite inhibits relaxation and induces pulmonary artery muscle contraction in the newborn rat. *Free Radic Biol Med*. 2004,**37**(9),1384-1392.
9. BEVILACQUA L, RAMSEY JJ, HAGOPIAN K, *et al.* Effects of short- and medium-term calorie restriction on muscle mitochondrial proton leak and reactive oxygen species production. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004,**286**(5),E852-861.
10. BURKE TM, WOLIN MS. Hydrogen peroxide elicits pulmonary arterial relaxation and guanylate cyclase activation. *Am J Physiol*. 1987,**252**(4 Pt 2),H721-732.
11. COLOM B, OLIVER J, ROCA P, GARCIA-PALMER FJ. Caloric restriction and gender modulate cardiac muscle mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and oxidative damage. *Cardiovasc Res*. 2007,**74**(3),456-465.
12. DOENST T, GUTHRIE PH, CHEMNITIUS JM, *et al.* Fasting, lactate, and insulin improve ischemia tolerance in rat heart: a comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol*. 1996,**270**(5 Pt 2),H1607-1615.
13. FISHMAN AP. Hypoxia on the pulmonary circulation. How and where it acts. *Circ Res*. 1976,**38**(4),221-231.
14. GHYCZY M, BOROS M. Electrophilic methyl groups present in the diet ameliorate pathological states induced by reductive and oxidative stress: a hypothesis. *Br J Nutr*. 2001,**85**(4),409-414.
15. GOLDSTEIN BD, MCDONAGH EM. Spectrofluorescent detection of in vivo red cell lipid peroxidation in patients treated with diaminodiphenylsulfone. *J Clin Invest*. 1976,**57**(5),1302-1307.
16. GREDILLA R, BARJA G, LOPEZ-TORRES M. Effect of short-term caloric restriction on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria and location of the free radical source. *J Bioenerg Biomembr*. 2001,**33**(4),279-287.
17. GUPTE SA, KAMINSKI PM, FLOYD B, *et al.* Cytosolic NADPH may regulate differences in basal Nox oxidase-derived superoxide generation in bovine coronary and pulmonary arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005,**288**(1),H13-21.

18. HAHN SM, MITCHELL JB, SHACTER E. Tempol inhibits neutrophil and hydrogen peroxide-mediated DNA damage. *Free Radic Biol Med.* 1997,**23**(6),879-884.
19. HAMPL V. Úloha oxidu dusnatého v normálním plicním oběhu a při plicní hypertenzi [Habilitationální práce]. Praha: Univerzita Karlova v Praze; 1997.
20. HAMPL V, ARCHER SL, NELSON DP, WEIR EK. Chronic EDRF inhibition and hypoxia: effects on pulmonary circulation and systemic blood pressure. *J Appl Physiol.* 1993,**75**(4),1748-1757.
21. HAMPL V, HERGET J. Perinatal hypoxia increases hypoxic pulmonary vasoconstriction in adult rats recovering from chronic exposure to hypoxia. *Am Rev Respir Dis.* 1990,**142**(3),619-624.
22. HAMPL V, HERGET J. Role of Nitric Oxide in the Pathogenesis of Chronic Pulmonary Hypertension. *Physiol Rev.* 2000,**80**(4),1337-1372.
23. HAUSENLOY DJ, YELLON DM. The mitochondrial permeability transition pore: its fundamental role in mediating cell death during ischaemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 2003,**35**(4),339-341.
24. HERGET J, FRYDRYCHOVA M, KAWIKOVA I, MCMURTRY IF. Thyroxine treatment increases the hypoxic pulmonary vasoconstriction in isolated lungs from thyroidectomized rats. *Bull Eur Physiopathol Respir.* 1987,**23**(3),217-221.
25. HERGET J, MCMURTRY IF. Effects of ouabain, low K<sup>+</sup>, and aldosterone on hypoxic pressor reactivity of rat lungs. *Am J Physiol.* 1985,**248**(1 Pt 2),H55-60.
26. CHANDRASEKAR B, NELSON JF, COLSTON JT, FREEMAN GL. Calorie restriction attenuates inflammatory responses to myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001,**280**(5),H2094-2102.
27. CHEN V, IANUZZO CD, FONG BC, SPITZER JJ. The effects of acute and chronic diabetes on myocardial metabolism in rats. *Diabetes.* 1984,**33**(11),1078-1084.
28. IMANI A, FAGHIHI M, SADR SS, *et al.* Noradrenaline protects in vivo rat heart against infarction and ventricular arrhythmias via nitric oxide and reactive oxygen species. *J Surg Res.* 2011,**169**(1),9-15.
29. JOHNSON JB, SUMMER W, CUTLER RG, *et al.* Alternate day calorie restriction improves clinical findings and reduces markers of oxidative stress and inflammation in overweight adults with moderate asthma. *Free Radic Biol Med.* 2007,**42**(5),665-674.
30. JUDGE S, JUDGE A, GRUNE T, LEEUWENBURGH C. Short-term CR decreases cardiac mitochondrial oxidant production but increases carbonyl content. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004,**286**(2),R254-259.
31. LAFFEL L. Ketone bodies: a review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* 1999,**15**(6),412-426.
32. LI C, JACKSON RM. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002,**282**(2),C227-241.
33. LILLEY E, GIBSON A. Antioxidant protection of NO-induced relaxations of the mouse anococcygeus against inhibition by superoxide anions, hydroquinone and carboxy-PTIO. *Br J Pharmacol.* 1996,**119**(2),432-438.
34. LIPINSKI B. Evidence in support of a concept of reductive stress. *Br J Nutr.* 2002,**87**(1),93-94; discussion 94.
35. LIU JQ, SHAM JS, SHIMODA LA, *et al.* Hypoxic constriction and reactive oxygen species in porcine distal pulmonary arteries. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003,**285**(2),L322-333.
36. LIU JQ, ZELKO IN, ERBYNN EM, *et al.* Hypoxic pulmonary hypertension: role of superoxide and NADPH oxidase (gp91phox). *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006,**290**(1),L2-10.

37. LOCHNER A, GENADE S, TROMP E, *et al.* Ischemic preconditioning and the beta-adrenergic signal transduction pathway. *Circulation*. 1999,**100**(9),958-966.
38. MARINA PRENDES MG, GARCIA JV, FERNANDEZ MA, *et al.* Effects of 5-hydroxydecanoate and ischemic preconditioning on the ischemic-reperfused heart of fed and fasted rats. *J Physiol Biochem*. 2005,**61**(3),447-456.
39. MARINA PRENDES MG, GONZALEZ MS, TORRESIN ME, *et al.* Involvement of mitochondrial permeability transition, glutathione status, pentose phosphate pathway and oxidative damage in the protective effect of fasting on the ischaemic-reperfused rat heart. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2009,**36**(7),637-642.
40. MARSHALL C, MAMARY AJ, VERHOEVEN AJ, MARSHALL BE. Pulmonary artery NADPH-oxidase is activated in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1996,**15**(5),633-644.
41. MCMURTRY IF. Angiotensin is not required for hypoxic constriction in salt solution-perfused rat lungs. *J Appl Physiol*. 1984,**56**(2),375-380.
42. MINTZ S, ROBIN ED. Redox state of free nicotinamide-adenine nucleotides in the cytoplasm and mitochondria of alveolar macrophages. *J Clin Invest*. 1971,**50**(6),1181-1186.
43. MITCHELL GA, KASSOVSKA-BRATINOVA S, BOUKAFTANE Y, *et al.* Medical aspects of ketone body metabolism. *Clin Invest Med*. 1995,**18**(3),193-216.
44. MITCHELL JR, VERWEIJ M, BRAND K, *et al.* Short-term dietary restriction and fasting precondition against ischemia reperfusion injury in mice. *Aging Cell*. 2010,**9**(1),40-53.
45. MIURA T, DOWNEY JM, HOTTA D, IIMURA O. Effect of superoxide dismutase plus catalase on myocardial infarct size in rabbits. *Can J Cardiol*. 1988,**4**(8),407-411.
46. MOUDGIL R, MICHELAKIS ED, ARCHER SL. Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J Appl Physiol*. 2005,**98**(1),390-403.
47. NECKAR J, OSTADAL B, KOLAR F. Acute but not chronic tempol treatment increases ischemic and reperfusion ventricular arrhythmias in open-chest rats. *Physiol Res*. 2008,**57**(4),653-656.
48. NECKAR J, PAPOUSEK F, NOVAKOVA O, *et al.* Cardioprotective effects of chronic hypoxia and ischaemic preconditioning are not additive. *Basic Res Cardiol*. 2002,**97**(2),161-167.
49. RAVINGEROVA T, NECKAR J, KOLAR F. Ischemic tolerance of rat hearts in acute and chronic phases of experimental diabetes. *Mol Cell Biochem*. 2003,**249**(1-2),167-174.
50. RAVINGEROVA T, PYNE NJ, PARRATT JR. Ischaemic preconditioning in the rat heart: the role of G-proteins and adrenergic stimulation. *Mol Cell Biochem*. 1995,**147**(1-2),123-128.
51. REEVE HL, MICHELAKIS E, NELSON DP, *et al.* Alterations in a redox oxygen sensing mechanism in chronic hypoxia. *J Appl Physiol*. 2001,**90**(6),2249-2256.
52. RETTIG J, HEINEMANN SH, WUNDER F, *et al.* Inactivation properties of voltage-gated K<sup>+</sup> channels altered by presence of beta-subunit. *Nature*. 1994,**369**(6478),289-294.
53. SAINZ J, WANGENSTEEN R, RODRIGUEZ GOMEZ I, *et al.* Antioxidant enzymes and effects of tempol on the development of hypertension induced by nitric oxide inhibition. *Am J Hypertens*. 2005,**18**(6),871-877.
54. SHEN D, DALTON TP, NEBERT DW, SHERTZER HG. Glutathione redox state regulates mitochondrial reactive oxygen production. *J Biol Chem*. 2005,**280**(27),25305-25312.

55. SKOUMALOVA A, HERGET J, WILHELM J. Hypercapnia protects erythrocytes against free radical damage induced by hypoxia in exposed rats. *Cell Biochem Funct.* 2008,**26(7)**,801-807.
56. STOWE DF, CAMARA AK. Mitochondrial reactive oxygen species production in excitable cells: modulators of mitochondrial and cell function. *Antioxid Redox Signal.* 2009,**11(6)**,1373-1414.
57. TATE RM, VANBENTHUYSEN KM, SHASBY DM, *et al.* Oxygen-radical-mediated permeability edema and vasoconstriction in isolated perfused rabbit lungs. *Am Rev Respir Dis.* 1982,**126(5)**,802-806.
58. THIEMERMANN C. Membrane-permeable radical scavengers (tempol) for shock, ischemia-reperfusion injury, and inflammation. *Crit Care Med.* 2003,**31(1 Suppl)**,S76-84.
59. THOMPSON JS, JONES RD, ROGERS TK, *et al.* Inhibition of hypoxic pulmonary vasoconstriction in isolated rat pulmonary arteries by diphenyleneiodonium (DPI). *Pulm Pharmacol Ther.* 1998,**11(1)**,71-75.
60. VARADY KA, HUDAK CS, HELLERSTEIN MK. Modified alternate-day fasting and cardioprotection: relation to adipose tissue dynamics and dietary fat intake. *Metabolism.* 2009,**58(6)**,803-811.
61. WALKER MJ, CURTIS MJ, HEARSE DJ, *et al.* The Lambeth Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia infarction, and reperfusion. *Cardiovasc Res.* 1988,**22(7)**,447-455.
62. WAN R, CAMANDOLA S, MATTSON MP. Intermittent food deprivation improves cardiovascular and neuroendocrine responses to stress in rats. *J Nutr.* 2003,**133(6)**,1921-1929.
63. WAYPA GB, CHANDEL NS, SCHUMACKER PT. Model for hypoxic pulmonary vasoconstriction involving mitochondrial oxygen sensing. *Circ Res.* 2001,**88(12)**,1259-1266.
64. WAYPA GB, SCHUMACKER PT. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: redox events in oxygen sensing. *J Appl Physiol.* 2005,**98(1)**,404-414.
65. WEIR EK, ARCHER SL. The mechanism of acute hypoxic pulmonary vasoconstriction: the tale of two channels. *FASEB J.* 1995,**9(2)**,183-189.
66. WILHELM J, HERGET J. Hypoxia induces free radical damage to rat erythrocytes and spleen: analysis of the fluorescent end-products of lipid peroxidation. *Int J Biochem Cell Biol.* 1999,**31(6)**,671-681.
67. WILLIAMSON DH, LUND P, KREBS HA. The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver. *Biochem J.* 1967,**103(2)**,514-527.
68. WOLIN MS. Reactive oxygen species and the control of vascular function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009,**296(3)**,H539-549.
69. YELLON DM, HAUSENLOY DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med.* 2007,**357(11)**,1121-1135.
70. ZHANG X, MIN X, LI C, *et al.* Involvement of reductive stress in the cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of heat shock protein 27. *Hypertension.* 2010,**55(6)**,1412-1417.
71. ZOU Z, SASAGURI S, RAJESH KG, SUZUKI R. dl-3-Hydroxybutyrate administration prevents myocardial damage after coronary occlusion in rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002,**283(5)**,H1968-1974.
72. ZWEIER JL, TALUKDER MA. The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 2006,**70(2)**,181-190.

## 7 Publikace autora

### 7.1 *Publikace in extenso, které jsou podkladem dizertace*

#### 7.1.1 S impakt faktorem

ŠNOREK M, HODYC D, ŠEDIVÝ V, DURISOVÁ J, SKOUMALOVÁ A, WILHELM J, NECKÁŘ J, KOLÁŘ F, HERGET J. Short-term fasting reduces the extent of myocardial infarction and incidence of reperfusion arrhythmias in rats. *Physiol Res.* 2013,**61**(6),567-74. IF 1,555

HODYC D, ŠNOREK M, BRTNICKÝ T, HERGET J. Superoxide dismutase mimetic tempol inhibits hypoxic pulmonary vasoconstriction in rats independently of nitric oxide production. *Exp Physiol.* 2007,**92**(5),945-51. IF 3,211

### 7.2 *Publikace in extenso, bez vztahu k tématu dizertace*

#### 7.2.1 S impakt faktorem

BULAVA A, HANIŠ J, SITEK D, OŠMERA O, KARPIANUS D, ŠNOREK M, REHOŠKOVÁ K, TOUŠEK F, PEŠL L. Catheter ablation for paroxysmal atrial fibrillation: a randomized comparison between multielectrode catheter and point-by-point ablation. *Pacing Clin Electrophysiol.* 2010,**33**(9),1039-46. IF 1,351

#### 7.2.2 Bez impakt faktoru

KOVÁŘÍK A, ŠULDA M, ŠNOREK M, TOUŠEK F. Postavení noradrenalinu mezi vazopresory v léčbě kardiogenního šoku komplikujícího akutní infarkt myokardu. *Interv Akut Kardiol.* 2011, **10**(5-6),223-224.

ŠNOREK M, VERNER M, TOUŠEK F, PEŠL L. Nekardiální příčiny elevace srdečního troponinu I v Nemocnici České Budějovice, a.s. *Cor Vasa* 2011,**53**,481-485.

KUBÁNEK M, ELLEDER M, SIKORA J, ŠRAMKO M, MALUŠKOVÁ J, DVOŘÁKOVÁ L, VLÁŠKOVÁ H, KOTRČ M, VRBSKÁ J, RIDZOŇ P, ŠNOREK M, TOUŠEK F, MÁLEK I, PIRK J. Danonova nemoc – porucha autofagie jako příčina hypertrofické kardiomyopatie. *Cor Vas.* 2010,**52**,706–712.